

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CAMPUS DE CURITIBANOS
CAMILA BITENCOURT

CITOGENÉTICA E PALINOLOGIA DE *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae)

Curitibanos
2016

CAMILA BITENCOURT

CITOGENÉTICA E PALINOLOGIA DE *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae)

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Agronomia do Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitiba da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro

Coorientadora: Cintia Luiza da Silva Luz

Curitiba
2016

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.**

Bitencourt, Camila
Citogenética e Palinologia de *Schinus terebinthifolia*
Raddi (Anacardiaceae) / Camila Bitencourt; orientadora,
Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro; coorientadora,
Cintia Luiza da Silva Luz. - Curitibanos, SC, 2016.
39 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Aroeira-vermelha. 3. Citogenética. 4.
Palinologia. 5. *Schinus* L.. I. Pierre Castro, Patrícia
Maria Oliveira. II. da Silva Luz, Cintia Luiza. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Agronomia. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Gaboardi Km1
CP: 101 CEP: 89150-000 - Curitiba/PR - BR
TELEFONE (048) 3731-2178 - mail: agronomia.cba@contato.ufsc.br

CAMILA BITENCOURT

Citogenética e Palinologia de *Schinus terebinthifolia* Raddi. (Anacardiaceae).

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao
Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus
Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito para obtenção do título de Bacharel em
Agronomia.

Orientador(a): Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro

Data da defesa:

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador: Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro
Titulação: Doutora
Área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas / Citogenética de Plantas
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Ana Carolina da Costa Lara Fioreze
Titulação: Doutora
Área de concentração em Melhoramento Genético de Grandes Culturas
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Jussara Cristina Stinghen
Titulação: Mestre
Área de concentração em Produção Vegetal
Universidade Federal de Santa Catarina

Local: Universidade Federal de Santa Catarina
Campus de Curitibanos
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalhe dos frutos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi.....	10
Figura 2. Sementes de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi submetidas aos testes de assepsia.....	20
Figura 3. Núcleo interfásico e cromossomos metafásicos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi. A) Núcleo interfásico arreticulado composto. B) Cariótipo com 2n=28 cromossomos.....	21
Figura 4. Células de <i>S. terebinthifolius</i> Raddi submetidas à coloração com fluorocromo DAPI. A) Núcleo interfásico com regiões ricas em AT distribuídas por toda a cromatina. B) Cromossomos metafásicos com regiões ricas em AT próximas ao centrômero e telômero.....	22
Figura 5. Tétrades de indivíduos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi. A) Tétrade normal. B) Tríade (seta) e tétrade normal. Barras=10µm.....	24
Figura 6. Grãos de pólen de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi submetidos a diferentes métodos de coloração para a análise da viabilidade. A-B) Grãos de pólen corados com Carmim acético. C-D) Grãos de pólen corados com o corante Alexander. Setas indicam grãos de pólen inviáveis. Barras=10µm.....	26
Figura 7. Grãos de pólen de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi submetidos a diferentes métodos de coloração citoquímica para análise da composição química. A) Grãos de pólen amido-positivo (coloração marrom). B) Grãos de pólen lipídeo-positivo (coloração vermelha).....	27
Figura 8. Morfologia dos grãos de pólen da espécie <i>S. terebinthifolia</i> Raddi. A) Grão de pólen acetolisado na visão polar. B) Grão de pólen acetolisado na visão equatorial. C) Microscopia eletrônica de varredura de pólen na visão polar. D) Microscopia eletrônica de varredura de pólen na visão equatorial. Barras=5µm (Figuras A-C); Barra=10µm (Figura D).....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de assepsia aplicados às sementes de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi (Anacardiaceae).....	14
Tabela 2. Índice meiótico de indivíduos de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi.....	23
Tabela 3. Frequência de polens viáveis quando submetidos aos testes de Carmim acético e Solução Alexander.....	25
Tabela 4. Características morfológicas de grãos de pólen de <i>S. terebinthifolia</i> Raddi.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Chave para classificação de núcleos interfásicos descritos por Guerra, 1987.....	15
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	14
2.2 ANÁLISES CITOGENÉTICAS	14
2.2.1 Germinação de sementes.....	14
2.2.2 Análise mitótica	15
2.2.3 Bandeamento DAPI.....	16
2.2.4 Análise meiótica	16
2.3 ANÁLISE PALINOLÓGICA	16
2.3.1 Viabilidade polínica.....	16
2.3.2 Citoquímica	17
2.3.3 Morfologia polínica	18
2.3.4 Acetólise.....	18
2.3.5 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).....	19
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	20
3.1.1 Germinação das sementes	20
3.1.2 Análise mitótica e contagem cromossômica	21
3.1.3 Bandeamento dos cromossomos mitóticos	22
3.1.4 Comportamento meiótico.....	23
3.2 PALINOLOGIA	25
3.2.1 Viabilidade polínica.....	25
3.2.2 Caracterização citoquímica	27
3.2.3 Morfologia dos grãos de pólen.....	28
4 CONCLUSÕES.....	32
Abstract	33
REFERÊNCIAS	34

Citogenética e palinologia de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae)

Camila Bitencourt

Resumo

A espécie *S. terebinthifolia* Raddi apresenta grande importância socioeconômica podendo ser utilizada para a recuperação de áreas degradadas, arborização urbana, uso medicinal e condimentar. Além disso, seus frutos conhecidos como pimenta rosa exibem sabor suave e levemente apimentado podendo ser utilizados em diversos tipos de preparações culinárias. Embora apresente grande potencial de utilização, informações citogenéticas e palinológicas são escassas para a espécie. O presente trabalho teve como objetivo estudar aspectos citogenéticos e palinológicos de *S. terebinthifolia* Raddi. Para a análise mitótica, radículas foram obtidas a partir de sementes germinadas a 25°C em câmara úmida. As mesmas foram submetidas à técnica de maceração enzimática seguida de dissociação celular. Células interfásicas e cromossomos metafásicos assim obtidos foram corados com Giemsa e com solução de DAPI. Para análises meióticas e palinológicas, inflorescências em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas e fixadas. Anteras foram submetidas à técnica de esmagamento para a obtenção dos meiócitos e análise do índice meiótico. Grãos de pólen maduros foram utilizados para análises de viabilidade polínica com testes colorimétricos e foram avaliados citoquimicamente. Para a avaliação do padrão de ornamentação da exina e outras características polínicas, grãos de pólen maduros foram submetidos à técnica de acetólise e analisados sob microscopia de luz de campo claro e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados da análise mitótica confirmaram o número cromossômico relatado para espécie ($2n=4x=28$), com a presença de cromossomos muito pequenos, simétricos e com regiões ricas em Adenina/Timina teloméricas e pericentroméricas. Esses dados corroboram a uniformidade cromossômica do gênero. A espécie apresentou índices meióticos superiores a 95% embora tenha apresentado baixo índice de viabilidade polínica (62% e 68% para os corantes Carmim acético 5% e Solução de Alexander, respectivamente). Os grãos de pólen mostraram-se amido e lipídeo positivos. A morfometria polínica revelou grãos de pólen de pequeno tamanho, com âmbito triangular, de forma oblato-esferoidal e tricolporado. Além disso, através das análises com microscopia eletrônica de varredura, a exina foi caracterizada como estriada-reticulada. Estes dados são importantes podendo contribuir e ser utilizados em estudos sistemáticos, taxonômicos, evolutivos. Do mesmo modo, também podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável da espécie.

Palavras-chave: Aroeira-vermelha. Número cromossômico. Índice meiótico. Morfologia polínica.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas, representando quase 19% da flora mundial (MMA, 1998). Para maior parte das espécies esse patrimônio natural é um dos principais ativos brasileiros e, seguramente, pode desempenhar papel estratégico no desenvolvimento nacional e elevação da qualidade de vida da população brasileira. Os recursos vegetais nativos, além de fontes de alimentos, podem ser utilizados para obtenção de fibras, madeiras, pigmentos, condimentos, aromas, energia e de princípios ativos para a produção de medicamentos (CORADIN, SIMINSKI, REIS, 2011).

Um exemplo de família com grande potencial é Anacardiaceae que merece amplo destaque por apresentar espécies de importância econômica, fornecendo frutos comestíveis, tais como o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), a manga (*Mangifera indica* L.), espécies do gênero *Spondias* L., conhecidas popularmente como cajás, umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) e seriguela (*Spondias purpurea* L.). Também apresentam espécies que fornecem madeiras úteis, como o exemplo da braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.), algumas espécies ornamentais (*S. molle* L.) e espécies condimentares, como é o caso de *S. terebinthifolia* Raddi (Figura 1), conhecida popularmente como pimenta rosa ou pimenta da Jamaica.



Figura 1. Detalhe dos frutos de *S. terebinthifolia* Raddi (Fonte: Patrícia M.O. Pierre)

A família Anacardiaceae possui aproximadamente 82 gêneros e 800 espécies, presentes em ambientes secos a úmidos, principalmente em terras baixas nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, estendendo-se até regiões temperadas (PELL et al., 2011; WEEKS et al., 2014). No Brasil, ocorrem 13 gêneros e 53 espécies, com destaque para *Schinus* L., gênero com maior riqueza de espécies e expressivo nas formações vegetacionais da região Sul.

O gênero *Schinus* possui aproximadamente 33 espécies restritas à América do Sul, com exceção de *S. molle* L. e *S. terebinthifolia* Raddi, espécies invasivas amplamente distribuídas pelas Américas. No Brasil há registro de onze espécies e sete variedades (MUÑOZ, 2000). Dessas sete espécies, quatro variedades do gênero podem ser encontradas em diferentes regiões apresentando uma vasta distribuição territorial. A extensão é dada desde o Rio Grande do Sul até o Rio Grande do Norte, fazendo parte da composição da Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e da Floresta Estacional Decidual (LORENZI, 2008; SABBI, ÂNGELO, BOEGER, 2010).

A espécie *S. terebinthifolia* Raddi, popularmente conhecida como aroeira-vermelha apresenta grande importância socioeconômica, sendo comumente utilizada para a recuperação de áreas degradadas, arborização urbana, além de apresentar uso medicinal e condimentar (RUAS, 2006). Adicionalmente, seus frutos conhecidos como pimenta rosa exibem sabor suave e levemente apimentado podendo ser utilizados em diversos tipos de preparações culinárias (SANTOS et al., 2007).

A espécie apresenta flores masculinas e femininas muito pequenas, dispostas em panículas piramidais que florescem de novembro a março (LORENZI, MATOS, 2002). Seus frutos com cerca de 5 mm de diâmetro são classificados como drupa do tipo globóide, são adocicados, aromatizados, brilhantes e de cor avermelhada atribuindo a planta na época da frutificação um atrativo à fauna (CORADIN, SIMINSKI, REIS, 2011; LORENZI, MATOS, 2002).

Sob o ponto de vista fitoquímico, *S. terebinthifolia* Raddi merece amplo destaque. O extrato e o óleo essencial extraídos das folhas possuem grande potencial apresentando efeitos fungicida, antimicrobiano, inseticida, antibacteriano e cicatrizante (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, PRADO, 2005; RIBAS et al., 2006; SANTOS et al., 2010; SILVA et al., 2010). Extratos hidroalcoólicos da planta foram utilizados na produção de um gel vaginal pelos autores Amorim, Santos (2003). Esses foram testados em um ensaio clínico randomizado e possibilitaram no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico oferecido atualmente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Este medicamento, denominado Kronel®,

constitui de um gel ginecológico usado no tratamento de infecções vaginais. Isso demonstra que a espécie tornou-se mais uma opção terapêutica aos usuários do SUS. Além disso, o desenvolvimento de fitoterápicos contribui ao uso sustentável da biodiversidade nacional, desenvolvimento da agricultura, indústria e incentivo à criação de novos empregos (ALMEIDA, LEITE, 2010).

Devido o aumento da utilização de materiais nativos com potencial socioeconômico e da crescente preocupação com a conservação de germoplasmas expostos as mudanças ambientais, as análises citogenéticas, morfológicas e reprodutivas são excelentes meios de contribuições aos estudos de um grupo de espécies vegetais (BIONDO, MIOTTO, SCHIFINO-WITTMANN, 2005).

Conforme Guerra (1988), a citogenética compreende todo e qualquer estudo da morfologia, organização, função, replicação, variação e evolução dos cromossomos, sejam eles isolados ou em conjunto, condensados ou distendidos. A análise cromossômica sempre foi um dos campos mais excitantes da citologia e da genética, podendo ser aplicada a estudos evolutivos e de divergência, estudos de citotaxonomia e de sistemática, na caracterização de germoplasmas, na identificação de anomalias cromossômicas na meiose (mutações cromossômicas), entre outros (TECHIO, 2002).

Além da contagem do número cromossômico, uma ferramenta utilizada é a técnica de bandeamento com corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). O emprego desta técnica possibilita uma análise mais detalhada dos cariótipos fazendo com que a cor azul brilhante destaque regiões heterocromáticas ricas em bases adenina/timina (AT) ao longo de metáfases mitóticas (COELHO, 2009).

Diversos autores realizaram estudos de análises meióticas, e estas análises revelaram características e comportamentos cromossômicos visualizados somente neste tipo de divisão celular. O comportamento meiótico de uma planta está diretamente relacionado ao seu grau de fertilidade, fazendo com que as alterações observadas durante este processo interfiram diretamente na viabilidade dos grãos de pólen (MARTINS et al., 2010), que pode ser verificada por meio de testes colorimétricos, como o emprego do Carmim acético 5% e da Solução de Alexander.

A ciência que estuda as paredes dos grãos de pólen e esporos é chamada de palinologia (TAKAHASHI, 1997). Estas estruturas microscópicas são formadas dentro das flores, no interior das anteras através da divisão meiótica (GASPARINO, CRUZ-BARROS, 2006). Os atributos que tornam os grãos de pólen adequados para estudos estão relacionados ao fato deles variarem em sua forma, e essa variação é herdável mostrando altos níveis de

consistência dentro de um táxon. De acordo com o Júnior et al., (2006) estudos de pólen baseiam-se principalmente nas características morfológicas relacionadas ao tamanho, forma, aberturas e ornamentação. Essas características estabelecidas geneticamente não estão sujeitas às variações do ambiente, tornando-as estáveis e de grande valor para a taxonomia permitindo a caracterização de famílias, gêneros e espécies (JÚNIOR et al., 2006; BLACKMORE, 2007).

Outra alternativa ao estudo dos grãos de pólen se refere às análises citoquímicas muito utilizadas para avaliar a presença de materiais dos grãos de pólen. Dentre eles, destaca-se o uso dos corantes Lugol e Sudan IV. Estes corantes reagem especificamente com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro (PAGLIARINI, POZZOBON, 2004). De acordo com Baker & Baker (1979), a presença de amido no pólen seria uma adaptação das plantas para evitar a ação de insetos não polinizadores que se alimentam de pólen, ao passo que a presença de lipídeos surgiu como uma adaptação das plantas para atrair polinizadores.

De maneira geral, o emprego de técnicas citológicas para *S. terebinthifolia* Raddi são escassas e este fato deve-se principalmente ao tamanho reduzido de suas flores e radículas que limitam suas análises e interpretações. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o número cromossômico e o nível de ploidia, analisar o comportamento meiótico e observar o padrão de distribuição de sequências ricas em adenina/timina ao longo dos cromossomos. Por fim, buscou-se também analisar a viabilidade polínica e a possível presença de açúcares e lipídeos de reserva e caracterizar a morfologia dos grãos de pólen por meio de técnicas palinológicas.

Através deste estudo buscou-se contribuir para a caracterização citogenética e palinológica da espécie, além de disponibilizar dados que possam ser úteis a estudos sistemáticos, taxonômicos, evolutivos e que também possam auxiliar no desenvolvimento de estratégias de conservação e manejo sustentável da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Para a obtenção do material vegetal foram coletados frutos e inflorescências de diversos tamanhos de cinco indivíduos de populações naturais no município de Curitiba/SC. Logo após, as inflorescências foram fixadas em Carnoy (solução fixadora de etanol: ácido acético na proporção 3:1), por no mínimo 24 horas.

Diante disso, as análises citogenéticas e palinológicas da espécie *S. terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae), foram realizadas no laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitiba.

2.2 ANÁLISES CITOGENÉTICAS

2.2.1 Germinação de sementes

Após a coleta, frutos da espécie *S. terebinthifolia* Raddi, foram fotografados para a documentação de sua coloração, armazenados em sacos de papel e colocados à secagem à sombra. Após a secagem, foram submetidos à refrigeração. Em seguida, para a obtenção das radículas, tiveram seu pericarpo retirado manualmente e as sementes foram adicionadas em diferentes métodos para a assepsia (Tabela 1).

Após os testes, as mesmas foram colocadas em caixas de acrílico Gerbox com papel de germinação umedecido com água destilada. Foram realizadas para a espécie, 4 repetições com 50 sementes/repetição. As caixas foram acondicionadas em germinador, com sistema de iluminação e ambiente úmido a 25°C. A germinação foi avaliada entre 15 e 30 dias.

Tabela 1. Métodos de assepsia aplicados em sementes de *S. terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae).

Métodos	Lavagem das sementes	Assepsia
1	Água destilada (10 minutos)	Hipoclorito de sódio 2% (5 minutos)
2	Lavagem 1: Água destilada + detergente (sem aplicação) por 10 minutos Lavagem 2: Água destilada (10 minutos)	Hipoclorito de sódio 2% (5 minutos)
3	Lavagem 1: Água destilada + detergente (com aplicação) por 10 minutos Lavagem 2: Água destilada (30 minutos)	Hipoclorito de sódio 2% (5 minutos)

2.2.2 Análise mitótica

Para a realização da análise mitótica, utilizaram-se as radículas obtidas a partir da germinação das sementes e estas foram pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (3mM) por 3 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em água destilada e fixadas em etanol: ácido acético (3:1). Para a obtenção dos cromossomos mitóticos, as radículas foram colocadas em solução enzimática Pectinase/Celulase (sigma) em banho-maria por 4 horas à 37°C. As lâminas foram preparadas pela técnica de dissociação celular (CARVALHO, 1995). Para a obtenção do material de estudo as radículas foram fragmentadas sobre o microscópio estereoscópio Leica EZ. Em seguida, os cromossomos foram corados em solução de Giemsa 5% por 4 minutos. Os núcleos interfásicos foram classificados segundo a chave proposta por Guerra (1987), como indicado no Quadro 1. As imagens foram capturadas no microscópio de luz de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

Quadro 1. Chave para classificação de núcleos interfásicos descritos por Guerra, 1987.

1. Arreticulado

- Retículo cromatínico invisível ou fracamente corado.
- Cromocentros bem delineados.
- Eucromatina condensada praticamente ausente.

1.1 A. simples- Cromocentros com forma regular;

1.2 A. composto- Cromocentros com forma irregular

2. Semi-Reticulado

- Cromocentros simples ou ocasionalmente fundidos.
- Quantidade variável de eucromatina condensada.

2.1 S.M. Retículo fracamente corado- Cromocentros com forma regular, raramente mostrando prolongações de eucromatina condensada.

2.2 S.M. Retículo cromatínico medianamente corado- cromocentros com densidade muito variável e com forma geralmente irregular.

2.3 S.M. Retículo cromatínico profundamente corado

2.3.1 Tamanho- médio, freqüentemente compostos e com cromocentros de forma irregular.

2.3.2 Composto, grande e com cromocentros com forma irregular- retículo cromatínico levemente polarizado.

2.3.3 Simples, cromocentros pequenos e numerosos. Aparência geralmente granular e cromatina homogeneamente distribuída.

3. Reticulado

Retículo cromatínico intensamente corado, cromocentros pequenos de difícil visualização. Cromatina polarizada.

2.2.3 Bandeamento DAPI

Sobre as lâminas previamente descoradas em solução fixadora foram adicionados 50µL de solução de DAPI (2µg/mL). O material foi coberto com lamínula no escuro por 30 minutos. Em seguida, a lamínula foi retirada com um jato de água destilada e o material seco. As lâminas foram montadas em meio de montagem Glicerol/Tampão McIlvaine. A visualização das lâminas e a captura de imagens foram realizadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

2.2.4 Análise meiótica

Com a utilização do microscópio estereoscópio Leica EZ, as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (LOVE, 1949). Anteras jovens foram fragmentadas para a liberação das tétrades. Logo após, foi retirado o excesso de fragmento e adicionado uma gota do corante Alexander (ALEXANDER, 1980), por fim, foi adicionada a lamínula. Para avaliar o índice meiótico foram confeccionadas 5 lâminas/indivíduo. As mesmas foram analisadas através do método de varredura onde todas as tétrades encontradas foram analisadas. Para esta análise consideraram-se tétrades normais àquelas que apresentavam quatro células de tamanho igual e qualquer irregularidade foi considerada como anormal. O índice meiótico (IM) foi estimado de acordo com LOVE (1949):

$$\frac{\text{Número de tétrades normais}}{\text{Número de tétrades analisadas}} \times 100$$

As melhores imagens foram digitalizadas em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

2.3 ANÁLISE PALINOLÓGICA

2.3.1 Viabilidade polínica

Para a realização dos testes de viabilidade polínica, os grãos de pólen foram corados com a solução de Carmim acético 5% (KEARNS, INOUE, 1993) e com o corante de Alexander (ALEXANDER, 1980).

Os grãos de pólen avaliados foram obtidos através de anteras maduras originadas de botões florais previamente fixados em etanol: ácido acético (3:1). O material foi seccionado

sobre as lâminas com o auxílio do microscópio estereoscópio Leica EZ. Em cada lâmina adicionou-se uma gota do respectivo corante e da lamínula para os materiais serem analisados. Para os diferentes corantes, a fim de obter uma amostragem ao acaso, utilizou-se o método de varredura.

A contagem polínica foi feita através da confecção de 5 lâminas/indivíduo e 5 campos/lâmina, totalizando 3067 células. Para as lâminas coradas com Carmim acético 5%, foram considerados grãos de pólen viáveis aqueles que apresentaram coloração avermelhada e exina intacta, e grãos de pólen inviáveis aqueles com aspecto vazio, mal formados e/ou incolores. Para o corante Alexander foram considerados grãos de pólen viáveis aqueles bem formados e corados de roxo, e grãos de pólen inviáveis os de aspecto vazio e coloração esverdeada. Após a contagem, o percentual médio de grãos de pólen viáveis foi calculado e foi determinado o percentual de viabilidade polínica da espécie. As imagens foram capturadas em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

2.3.2 Citoquímica

Com o intuito de avaliar a presença de substâncias de reserva nos grãos de pólen, utilizaram-se as técnicas citoquímicas de acordo com Baker & Baker (1979). Para a obtenção dos grãos de pólen, anteras maduras foram fragmentadas sobre lâminas com o auxílio do microscópio estereoscópio Leica EZ. Logo após, foi feita a adição de uma gota do corante Lugol (para a identificação de amido), sendo considerados grãos de pólen amido positivo os que apresentaram coloração marrom e grãos de pólen amido negativos os que não apresentaram coloração.

O mesmo foi realizado para o corante Sudan IV (para a identificação de lipídeos), sendo considerado lipídeo positivo os grãos de pólen corados em vermelho e lipídeo negativos os não apresentaram coloração. Para os diferentes corantes, a fim de obter uma amostragem ao acaso, utilizou-se o método de varredura. A contagem polínica foi feita através da utilização de 5 lâminas/corante e 5 campos/lâmina, totalizando 400 células. A visualização e captura das imagens foi realizada em microscópio de luz de epifluorescência BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

2.3.3 Morfologia polínica

2.3.4 Acetólise

Para análise morfológica dos grãos de pólen de *S. terebinthifolia* Raddi, foi utilizada a técnica de acetólise proposta por Erdtman (1960). Anteras maduras provenientes das inflorescências fixadas foram separadas sob microscópio estereoscópio Leica EZ4, e em seguida colocadas em um microtubo de 2 mL contendo ácido acético P.A. O material foi macerado com o auxílio de um estilete adaptado para a liberação dos grãos de pólen e submetido a diferentes etapas de centrifugação. Todas as centrifugações tiveram a duração de 10 minutos a uma velocidade de 2500 rpm. Entre cada centrifugação, o sobrenadante foi retirado e adicionado:

- Etapa 1: Água destilada
- Etapa 2: Solução acetolítica contendo anidrido acético:ácido sulfúrico (9:1). Nessa etapa os microtubos foram submetidos a temperatura de 85°C por 2 minutos em banho-maria.
- Etapa 3: Água destilada com duas gotas de álcool etílico.
- Etapa 4: Água destilada.
- Etapa 5: Água glicerizada (solução contendo água destilada: glicerina 1:1). Após a última centrifugação o sobrenadante foi retirado, resultando em uma amostra de grãos de pólen depositado no fundo do microtubo (pellet).

Para a montagem das lâminas, os fragmentos cúbicos de gelatina glicerizada foram colocados em contato com os grãos de pólen acetolisados e sobre a amostra adicionada a lamínula. Para que ocorresse a fusão da gelatina glicerizada, a lâmina foi submetida a 110°C por 10 segundos em uma placa aquecedora. Por fim, as lamínulas foram seladas com esmalte e as análises microscópicas foram efetuadas uma semana após a montagem das lâminas, com o intuito de que ocorresse a deposição e o posicionamento dos grãos de pólen sobre a lâmina. As melhores imagens foram digitalizadas e obtidas através do microscópio de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

Os grãos de pólen foram caracterizados de acordo com agrupamento, tamanho, forma, polaridade, simetria, âmbito, tipo e número de aberturas, espessura da exina e escultura, onde foram capturadas imagens dos grãos de pólen nas visões polar e equatorial. Para grãos de pólen na visão equatorial, 25 grãos de pólen em seus eixos polar (P) e equatorial (E) foram

mensurados e valores de P/E foram calculados. Para medições na visão polar, foram avaliados 10 grãos de pólen, sendo medida a espessura da exina e comprimento da abertura. As terminologias e as classificações do tamanho dos grãos de pólen, da morfologia da superfície polínica na visão equatorial e do número de aberturas, foram adotadas de acordo com as definições de Erdtman (1952), citado por Willard et al., (2004) e de Punt et al., (1994), na edição disponível online, no site <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glosint.htm>.

2.3.5 Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. Para análise mais detalhada da escultura da parede dos grãos de pólen, anteras maduras provenientes de botões florais foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e transferidas para microtubos contendo álcool etílico P.A. Os mesmos foram submetidos à técnica descrita por Oliveira (2015).

Desse modo, uma gota de álcool etílico contendo as anteras foi depositada sobre *stubs* ou suportes metálicos contendo uma fita de carbono. Sobre o microscópio estereoscópio Leica EZ cada antera foi fragmentada longitudinalmente para a liberação dos grãos de pólen. Para a desidratação dos mesmos, foi adicionada sobre os grãos de pólen uma gota de HDMS (Hexamethyldisilazane). Em seguida, foram colocados para secar no dessecador. Após a secagem os suportes foram levados ao Sputtering (SCD050) para a metalização com ouro. As imagens digitalizadas foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

3.1.1 Germinação das sementes

Dentre as metodologias utilizadas para avaliar a assepsia das sementes (Figura 2), apenas o primeiro método permitiu a obtenção das radículas de *S. terebinthifolia* Raddi. Neste sentido, a lavagem das sementes com água destilada e o emprego do hipoclorito de sódio como tratamento, em associação com a temperatura de 25°C foram eficientes para a germinação das sementes de *S. terebinthifolia* Raddi.



Figura 2. Sementes de *S. terebinthifolia* Raddi submetidas aos testes de assepsia.

As radículas foram emitidas entre 15 - 30 dias após a semeadura, apresentando um percentual de germinação de 20%. Para a maior parte das repetições as sementes não germinaram e ocorreu o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos. Segundo Oliveira (2004), um dos problemas associados à baixa germinação é a incidência de patógenos, que podem infectar as sementes em todas as etapas de produção reduzindo a sua qualidade fisiológica.

Para que o processo de germinação ocorra é necessário que as sementes estejam viáveis e que as condições ambientais sejam favoráveis. Dentre os principais fatores ambientais pode-se citar a temperatura e a luz. Estes fatores podem ser controlados e manipulados otimizando a porcentagem, velocidade e uniformidade da germinação (SANTOS, FERREIRA, ÁQUILA, 2004).

Autores como Medeiros, Zanon (1998), realizaram estudos avaliando diferentes substratos e temperaturas na germinação das sementes de aroeira-vermelha. A germinação ocorreu através da utilização do papel toalha, no sistema rolo a uma temperatura de 20°C. Do mesmo modo, os autores Penãs et al., (2006) e Medeiros, Abreu (2005) realizaram estudos

para avaliar a germinação de sementes da espécie, que ocorreu entre 14 - 21 dias após a semeadura a uma temperatura de 20 a 25°C.

Estes estudos corroboram com o teste de germinação empregado no presente trabalho e confirmam que a temperatura ideal para a germinação das sementes em laboratório varia entre 20 a 25°C, possibilitando a obtenção de radículas de *S. terebinthifolia* Raddi para diferentes análises.

Para otimizar as avaliações das sementes de *S. terebinthifolia* Raddi, recomenda-se o emprego do teste de tetrazólio. Este teste além de avaliar diferentes níveis de viabilidade e vigor das sementes, fornece o diagnóstico das causas pela redução da qualidade, como danos mecânicos, danos na secagem e/ou deterioração por umidade que são os principais problemas que afetam a qualidade fisiológica das sementes. (COSTA, et al., 2007).

3.1.2 Análise mitótica e contagem cromossômica

As radículas provenientes da germinação das sementes de *S. terebinthifolia* Raddi foram utilizadas para a obtenção de cromossomos metafásicos. De acordo com a classificação proposta por Guerra (1987), os núcleos interfásicos apresentaram-se do tipo arreticulados compostos, com retículo cromatínico fracamente corado, cromocentros bem delineados com forma irregular (Figura 3A). O número cromossômico da espécie é $2n=28$ e o tamanho dos cromossomos variou entre 0,5 e 1µm (Figura 3B). O cariótipo mostrou-se simétrico, com pares cromossômicos muito similares entre si.

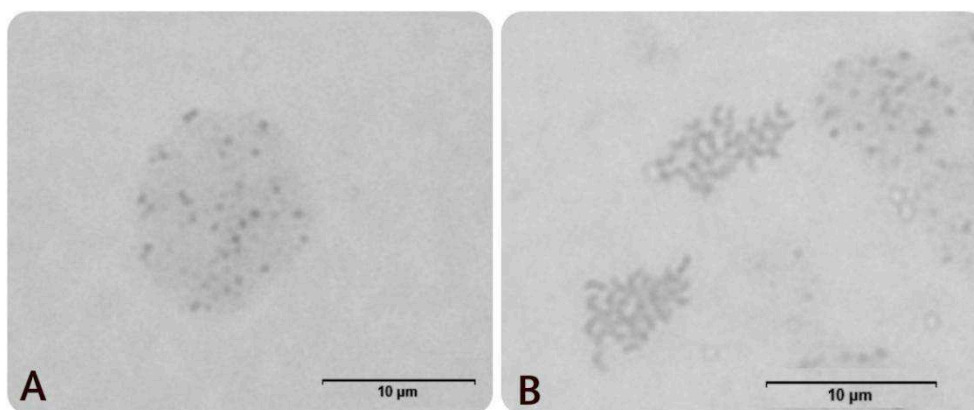


Figura 3. Núcleo interfásico e cromossomos metafásicos de *S. terebinthifolia* Raddi. A) Núcleo interfásico arreticulado composto. B) Cariótipo com $2n=28$ cromossomos.

Segundo Peñas et al., (2006), a espécie apresenta um número básico de $x=7$ e o número cromossômico é $2n=28$. Igualmente, Luz (2013) após analisar 22 indivíduos de *S. terebinthifolia* Raddi observou cromossomos de pequeno tamanho (média de 0,56µm), e descreveu o número cromossômico de $2n=4x=28$. Desse modo, a evolução cromossômica

ocorreu em nível tetraploide ($4x$), já que as contagens cromossômicas realizadas com a espécie indicam um número de $2n=28$.

Estes dados confirmam que o número cromossômico de *S. terebinthifolia* Raddi é de $2n=4x=28$. Além disso, estas informações podem auxiliar em estudos sistemáticos e evolutivos principalmente nas interpretações das relações intra e interespecíficas dentro de um grupo de espécies vegetais.

3.1.3 Bandeamento dos cromossomos mitóticos

A coloração com fluorocromo DAPI revelou segmentos ricos em Adenina e Timina concentrados em regiões teloméricas (setas) e regiões próximas aos centrômeros dos cromossomos (cabeças de seta) (Figura 4).

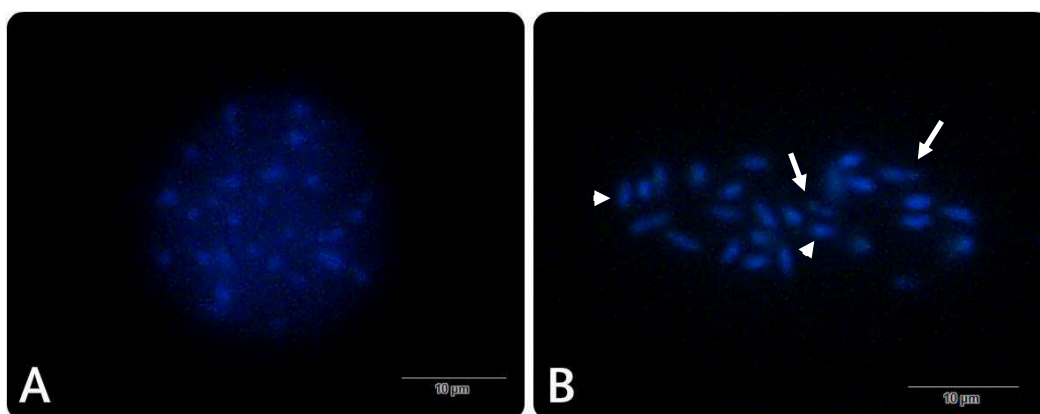


Figura 4. Células de *S. terebinthifolia* Raddi submetidas à coloração com fluorocromo DAPI. A) Núcleo interfásico com regiões ricas em AT distribuídas por toda a cromatina. B) Cromossomos metafásicos com regiões ricas em AT próximas ao centrômero e telômero.

Poucos estudos foram realizados com *S. terebinthifolia* Raddi, este fato está associado principalmente ao tamanho reduzido de suas radículas e flores que limitam as análises e interpretações. Dados cariotípicos como número cromossômico, número de constrições secundárias e padrão de coloração com DAPI e CMA₃ foram relatados para espécies ocorrentes na Argentina: *S. polygamus*, *S. areira*, *S. fasciculatus*, *S. johnstonii*, *S. odonelli*, *S. praecox* e *S. roigii* por PEÑAS et al. (2006). Para outras espécies como *S. molle*, *S. longifolius* e *S. terebinthifolia* os relatos citogenéticos limitam-se ao número cromossômico (OGINUMA et al. 1993, PEÑAS et al. 2006, FRANCO-CAIRO, GUEDES, OLIVEIRA, 2009).

Segundo JUDD et al., (2009) o tamanho dos cromossomos, a posição dos centrômeros e os padrões de bandeamento são dados importantes sob o ponto de vista sistemático. Por que

cada par de cromossomos apresenta um padrão distinto e bem característico de bandas, sendo possível localizar exatamente a região do cromossomo o que seria impossível com a coloração convencional (GUERRA, 1988). Além disso, estas informações podem contribuir e complementar hipóteses filogenéticas (STEBBINS, 1971).

3.1.4 Comportamento meiótico

Análises meióticas evidenciaram a presença de meiócitos em estágios de tétrade, indicando que as inflorescências coletadas estavam em estágios avançados de desenvolvimento, embora apresentassem tamanhos e coloração típicos de inflorescências jovens (tamanhos inferiores a 0,5 cm e coloração creme). Desse modo, não foram encontradas outras fases meióticas, possibilitando a avaliação, pela primeira vez para a espécie, do índice meiótico.

Todos os indivíduos avaliados apresentaram índices meióticos superiores a 95%, possuindo a maioria das tétrades normais (Tabela 2), com quatro células-filhas de tamanhos iguais e em posicionamento característico nas tétrades, indicando a normalidade do processo meiótico nos indivíduos analisados.

Tabela 2. Índice meiótico de indivíduos de *S. terebinthifolia* Raddi.

Índice meiótico	
Indivíduo	Frequência de tétrades normais
1	1,00
2	0,95
3	0,91
4	0,90
5	0,96
Média	0,95

A Figura 5 demonstra algumas das tétrades normais. Células anormais encontradas em baixo percentual apresentaram forma de tríades.

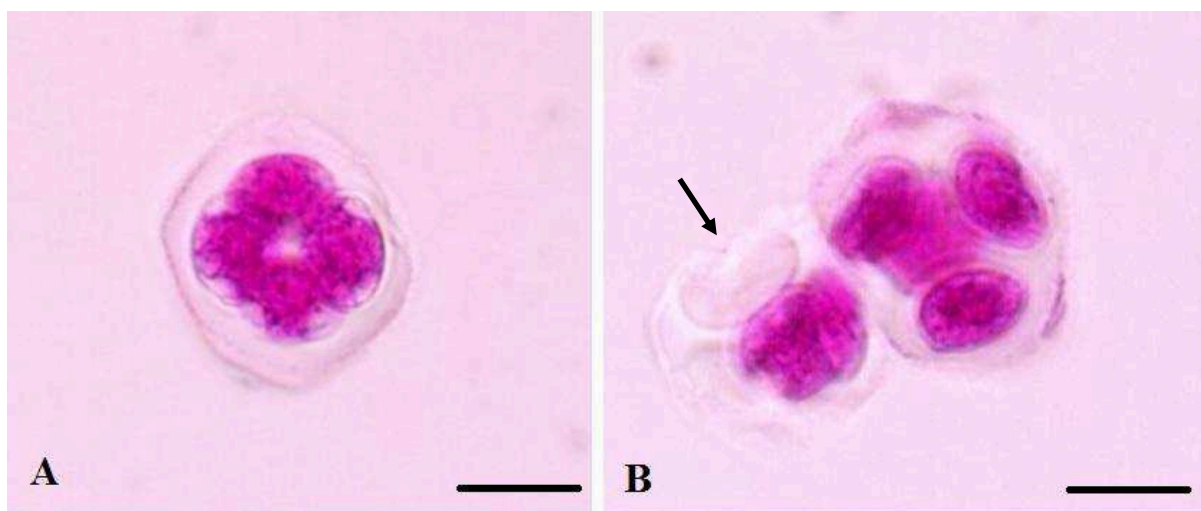


Figura 5. Tétrade de indivíduos de *S. terebinthifolia* Raddi. A) Tétrade normal. B) Triade (seta) e tétrade normal. Barras=10µm.

De acordo com Love (1949) as plantas que apresentam índices meióticos superiores a 90% são consideradas citologicamente estáveis, sendo o índice meiótico um dado complementar as análises meióticas (POZZOBON et al., 2011). Considerando que é durante a meiose que ocorre a recombinação dos genes e que os eventos da gametogênese são controlados por um grande número de genes, a meiose é considerada uma fonte de variabilidade genética que os organismos possuem para se adaptar ao ambiente em que vivem e, dessa forma, garantir a sua perpetuação da espécie (PAGLIARINI, 2000).

Para diferentes espécies do gênero *Schinus* L. estas informações são escassas. No entanto, para aferir a estabilidade meiótica de *S. terebinthifolia* Raddi, é importante que análises sobre o comportamento meiótico sejam realizadas, principalmente por que estes estudos revelam características e comportamentos cromossômicos visualizados somente neste tipo de divisão celular (PAGLIARINI, 2000).

Os dados de índice meiótico são importantes para a espécie *S. terebinthifolia* Raddi, principalmente para auxiliar nos estudos e informações sobre a fertilidade da espécie. Uma vez que, as anormalidades que ocorrem durante a meiose podem levar a formação de gametas com um número de cromossomos não balanceados e geralmente inviáveis podendo resultar em baixa produtividade.

3.2 PALINOLOGIA

3.2.1 Viabilidade polínica

Os testes colorimétricos utilizados nas condições que foram aplicados se mostraram confiáveis para verificar a viabilidade polínica, através do emprego do corante Carmim acético 5% e da Solução de Alexander. Os resultados variaram de acordo com o corante empregado. Por meio das análises foi possível observar que os percentuais de viabilidade foram muito similares em relação aos dois testes aplicados.

As análises realizadas com o corante Carmim acético mostram que 62% dos grãos de pólen avaliados encontravam-se viáveis. Do mesmo modo, o teste colorimétrico com Alexander mostrou uma viabilidade polínica de 68% (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de polens viáveis quando submetidos aos testes de Carmim acético e Solução Alexander.

Viabilidade polínica		
Frequência de polens viáveis		
Indivíduo	Carmim acético	Alexander
1	0,49	0,70
2	0,65	0,76
3	0,62	0,68
4	0,59	0,68
5	0,76	0,55
Média	0,62	0,68

A Figura 6 mostra grãos de polens da espécie *S. terebinthifolia* Raddi, estes submetidos aos diferentes métodos de coloração.

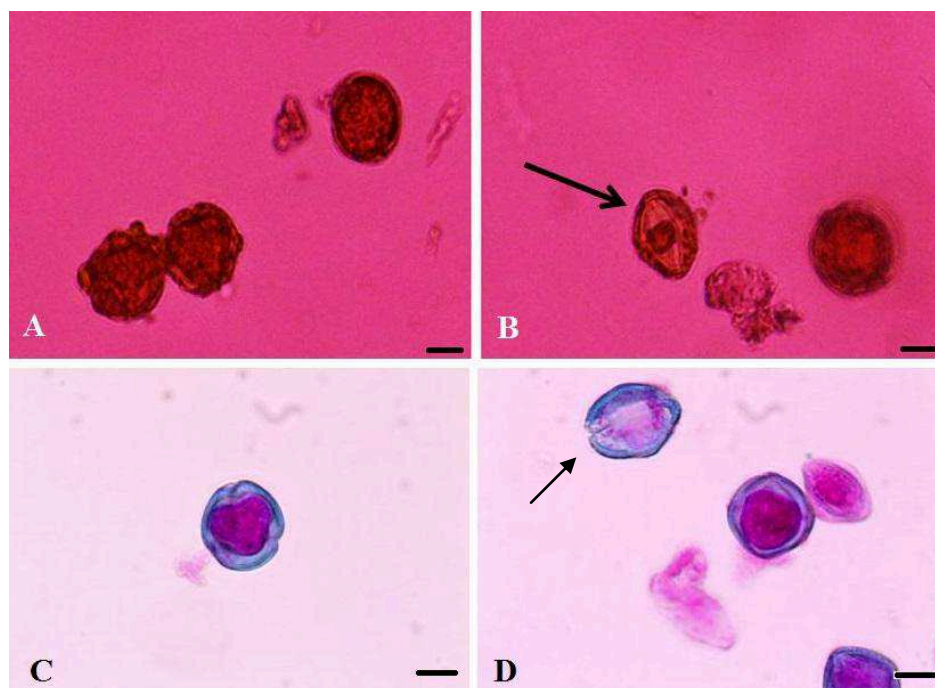


Figura 6. Grãos de pólen de *S. terebinthifolia* Raddi submetidos a diferentes métodos de coloração para a análise da viabilidade. A-B) Grãos de pólen corados com Carmim acético. C-D) Grãos de pólen corados com o corante Alexander. Setas indicam grãos de pólen inviáveis. Barras=10 μ m.

Percentuais de viabilidade polínica inferiores a 70% são considerados baixos, podendo ocasionar problemas para a espécie, principalmente a infertilidade. Considerando que as análises do índice meiótico realizadas no presente estudo indicaram alta normalidade meiótica, não podemos definir com exatidão as possíveis causas da baixa viabilidade polínica observadas em ambos os métodos de coloração.

Baixos valores de viabilidade polínica geralmente são originados de altas taxas de anormalidades meióticas, acarretando para a espécie diferentes graus de esterilidade (DIEGUES et al., 2015). Diversos autores como Loguercio e Battistin (2004) relatam que variações na viabilidade polínica podem ocorrer entre flores da mesma planta. Este fato também pode estar relacionado aos diferentes intempéries ambientais, ao estágio de maturação do grão de pólen e a época de coleta, entre outros (SANTOS et al., 2015).

As análises mostraram-se diferentes entre valores de índice meiótico e a viabilidade polínica, o que nem sempre é esperado, uma vez que a porcentagem da viabilidade polínica é o resultado dos eventos que ocorrem durante a divisão celular. Apesar dos resultados serem contrastantes, não se pode inferir através de testes colorimétricos que a espécie tenha problemas reprodutivos uma vez que a contagem polínica utiliza os parâmetros de

coloração/viabilidade e os grãos de pólen viáveis podem não apresentar coloração e serem subestimados e classificados como inviáveis. Embora a porcentagem de viabilidade polínica para ambos os testes esteja abaixo de 70%, os indivíduos analisados não apresentavam deficiências visíveis na produção de frutos, indicando que esta porcentagem de viabilidade polínica parece ser satisfatória para a perpetuação da espécie sobre as condições do seu habitat.

Análises do índice meiótico são altamente confiáveis, pois se baseiam na morfologia das tétrades e refletem diretamente a normalidade ou não do processo meiótico. Como a viabilidade foi estimada somente por meios de testes de coloração, os quais podem ser influenciados pelo ambiente de coleta, estágio de maturação polínica e variações em flores de uma mesma planta, o índice meiótico demonstra que os indivíduos analisados apresentam meiose regular. Diante disso, sugere-se que mais estudos devem ser realizados no intuito de se verificar a viabilidade polínica, como por exemplo, o emprego de testes de viabilidade em meio de cultura.

3.2.2 Caracterização citoquímica

Os grãos de pólen são formados basicamente por 20 a 50% de água, 50% carboidratos, 1-2% lipídios, 1,4-12% amido e proteínas (JÚNIOR et al., 2006). As análises colorimétricas realizadas com os corantes Lugol e Sudan IV revelam que os grãos de pólen de *S. terebinthifolia* Raddi apresentam amido e lipídios como substância de reserva (Figura 7).

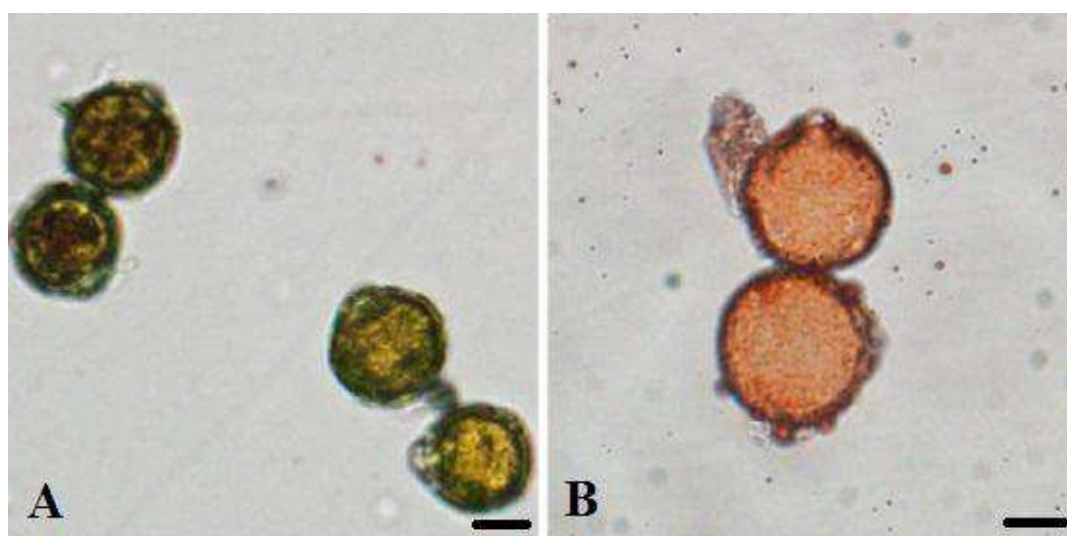


Figura 7. Grãos de pólen de *S. terebinthifolia* Raddi submetidos a diferentes métodos de coloração citoquímica para análise da composição química. A) Grãos de pólen amido-positivo (coloração marrom). B) Grãos de pólen lipídio-positivo (coloração vermelha).

Autores como Backer & Backer (1979) relatam que grãos de pólen amido positivo surgiram como uma adaptação das plantas para evitar a ação de insetos não polinizadores que se alimentam de pólen. Outro fato importante é que a presença de amido como substância de reserva auxilia na manutenção da viabilidade do grão de pólen (RODRIGUEZ-GARCIA et al., 2003; PACINI, GUARNIERI, NEPI, 2006).

A presença de lipídios nos grãos de pólen promove melhor aderência dos grãos com as anteras e com o estigma, também os protege contra a perda de água e radiação UV e mantém os grãos de pólen unidos durante o transporte (PACINI; HESSE, 2005). Os autores Wang, Zhang, Chen (2004) relatam que praticamente todas as angiospermas apresentam pólenes com lipídios na sua composição, sendo esta macromolécula importante para a atração de polinizadores.

Estudos realizados por Lenzi, Orth, Laroca, (2003), revelam que as abelhas são os polinizadores mais efetivos para *S. terebinthifolia* Raddi apresentando maior riqueza de espécies e frequência de visitas. Do mesmo modo, estudos avaliando a fenologia reprodutiva de *S. terebinthifolia* Raddi revelaram que a espécie tem comportamento dioico e entomófilo. Além disso, a semelhança entre flores masculinas e femininas pode contribuir para o sucesso reprodutivo por meio da atração de visitantes florais a plantas masculinas e femininas.

Diante das análises citoquímicas, os resultados indicam que a *S. terebinthifolia* Raddi apresenta uma polinização entomófila, sendo que os insetos polinizadores possivelmente não utilizam os grãos para sua alimentação.

3.2.3 Morfologia dos grãos de pólen

A palinotaxonomia é o ramo que estuda a taxonomia vegetal através de características polínicas (GASPARINO, CRUZ-BARROS, 2006). Tais como características relacionadas ao tamanho, forma, número de aberturas e ornamentação, permitindo caracterizar famílias, gêneros e espécies (JÚNIOR et al., 2006).

No presente estudo, análises morfométricas foram eficientes e permitiram realizar a descrição dos grãos de pólen de *S. terebinthifolia* Raddi, como descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Características morfológicas de grãos de pólen de *S. terebinthifolia* Raddi.

Características	Dimensões (µm)
Eixo polar (P)	21,58 (18,03 - 23,85)*
Eixo equatorial (E)	22,34 (18,23 – 25,62)*
Espessura da Exina	1,4 (1,5 – 1,6)*
P/E	0,96
* valor médio	
Morfologia	
Agrupamento	Mônades
Tamanho	Pequeno
Forma	Oblato-esferoidal
Polaridade	Isopolar
Simetria	Radial
Âmbito	Triangular
Tipo de abertura	Tricolporado
Escultura	Estriado-reticulado

As análises da microscopia eletrônica de varredura detalharam a morfologia dos grãos de pólen da espécie. Através dos resultados verificou-se a presença de estrias longas, paralelas e muito próximas, com retículos inconspícuos, podendo ser classificados como estriado-reticulado (AGUILAR-SIERRA, MELHEM, 1998) (Figura 8).

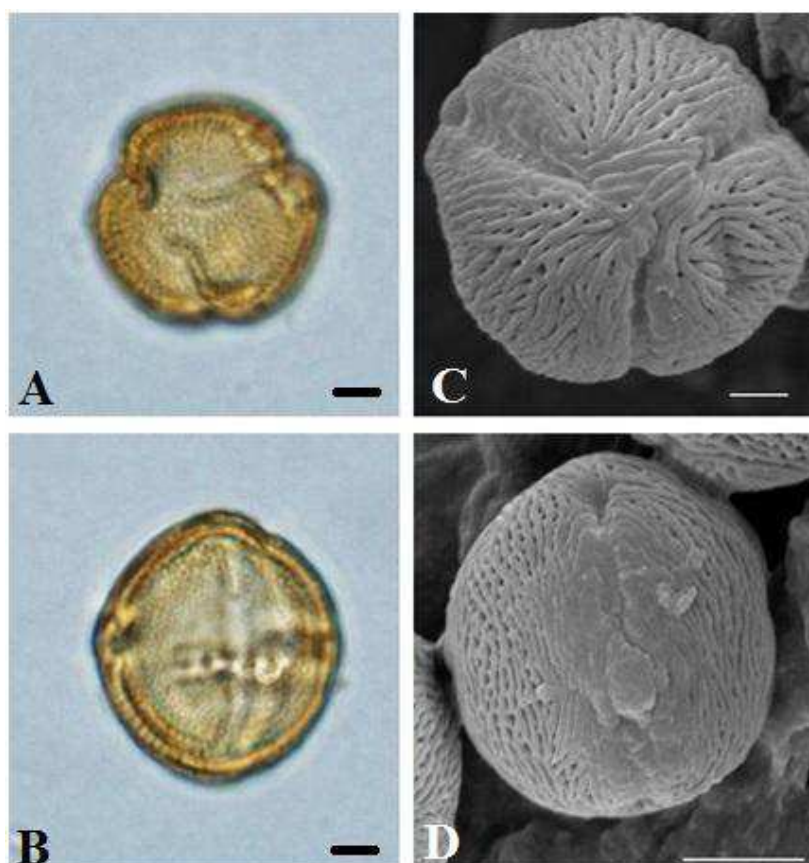


Figura 8. Morfologia dos grãos de pólen da espécie *S. terebinthifolia* Raddi. A) Grão de pólen acetolisado na visão polar. B) Grão de pólen acetolisado na visão equatorial. C) Microscopia eletrônica de varredura de pólen na visão polar. D) Microscopia eletrônica de varredura de pólen na visão equatorial. Barras=5µm (Figuras A-C); Barra=10µm (Figura D).

De acordo com Erdtman (1952), os grãos de pólen de espécies da família Anacardiaceae variam de pequenos à médios e podem apresentar forma de sub oblato-esferoidal, oblato-esferoidal ou prolato. São tricolporados, de superfície às vezes reticulada, estriado ou estriado-reticulado com o comprimento do eixo polar variando de 11,5 a 56 µm, e o comprimento do eixo equatorial variando de 13,5 a 49 µm (PEREIRA et al., 2014).

Para *S. terebinthifolia* Raddi, estudos sobre a morfologia polínica foram realizados por Punt et al., (1994) e Quintão et al., (2011), onde os grãos foram caracterizados como pequenos, de forma prolato-esferoidal, com ornamentação reticulada. Do mesmo modo, autores como Cruz-Barros, Gratino, (1997) avaliaram a morfologia dos grãos de polens de *S. terebinthifolia* Raddi var. *acutifolia*, onde os resultados apresentaram valor de P/E = 1,03, abertura tricolporada e exina reticulada.

Os diferentes estudos apresentaram resultados similares aos valores demonstrados na Tabela 4, como o exemplo do agrupamento, polaridade, âmbito, tamanho e o tipo de abertura. Entretanto, as análises com a microscopia de varredura revelaram detalhes mais precisos

sobre a ornamentação da exina confirmando apenas os estudos de Erdtman (1952), no qual relata que a ornamentação dos grãos de pólen da família Anacardiaceae pode se mostrar como estriado-reticulado.

Estes resultados são importantes para auxiliar aos estudos morfoanatômicos e fisiológicos. Estudos demonstram que *S. terebinthifolia* Raddi apresenta grande plasticidade morfológica em resposta aos diferentes habitats. Diferentes autores relatam para a espécie a ocorrência de ampla variação morfológica em relação à forma, tamanho, número, margem e ápice dos folíolos. A partir desses caracteres foram reconhecidas quatro variedades: *S. terebinthifolia* var. *acutifolius*, *S. terebinthifolia* var. *pohlianus*, *S. terebinthifolia* var. *raddianus* e *S. terebinthifolia* var. *rhoifolius* (CUDA, et al., 2006). No entanto, tais caracteres são inconsistentes, uma vez que a espécie possui ampla plasticidade morfológica em resposta a habitats com diferentes condições lumínicas (SABBI, ÂNGELO, BOEGER, 2010).

Os estudos da morfologia polínica podem auxiliar nestes estudos taxonômicos, uma vez que os grãos de pólen apresentam grande variabilidade que não estão sujeitas às alterações ambientais, sendo desta forma bastante estável tornando os estudos dos grãos de pólen altamente confiáveis (GASPARINO, CRUZ-BARROS, 2006). Estas informações podem complementar os dados morfológicos auxiliando, portanto na biosistemática e taxonomia do gênero.

4 CONCLUSÕES

O presente estudo foi de grande relevância, pois apresentou dados inéditos sobre a citogenética e palinologia de *S. terebinthifolia*, já que dados citogenéticos e palinológicos são escassos para espécies do gênero.

Análises mitóticas confirmaram o número cromossômico relatado para a espécie e demonstraram que o cariótipo é simétrico, com cromossomos pequenos e com bandas Adenina/Timina presentes nas regiões telomérica e pericentromérica, como relatado para outras espécies do gênero.

O índice meiótico, realizado pela primeira vez para a espécie indicou que os indivíduos analisados possuem meiose regular. No entanto, tais dados foram contrastantes com os resultados de viabilidade polínicas que foram obtidos através de testes colorimétricos, indicando que outros fatores podem influenciar na viabilidade dos mesmos e que testes com germinação polínica em meio de cultura devem ser realizados.

Os testes citoquímicos dos grãos de pólen indicaram que a espécie possivelmente apresenta polinização entomófila, sendo que os insetos polinizadores possivelmente não utilizam os grãos para sua alimentação devido à presença de amido e lipídeos acumulados em seu interior.

Avaliações da morfologia polínica permitiram confirmar aspectos sobre a forma, tamanho e a ornamentação polínica.

Os dados gerados no presente estudo poderão ser úteis como complemento a estudos sobre a biosistemática e evolutiva do gênero, já que a espécie possui ampla plasticidade fenotípica e problemas taxonômicos são frequentemente relatados. Além disso, tais dados poderão fornecer informações auxiliares em futuros programas de melhoramento genético e em trabalhos que envolvam diferentes estratégias de conservação da espécie.

Cytogenetics and palynology of *Schinus terebinthifolia* Raddi (Anacardiaceae)

Camila Bitencourt

Abstract

The species *S. terebinthifolia* Raddi presents a great socioeconomic importance and can be used in the recovery of degraded areas, urban afforestation and for medicinal or spice purposes. In addition its fruits known as pink pepper are tasty, lightly peppery and are frequently used in various types of culinary preparations. Despite the great potential of use, cytogenetic and palynological information is scarce for this species. The objective of this study was to analyze the cytogenetic and palynological aspects of *S. terebinthifolia* Raddi. For mitotic analysis, rootlets were obtained from seeds germinated at 25°C in a humid chamber. They were submitted to the technique of enzymatic maceration followed by cellular dissociation. Interphase and metaphase chromosomes thus obtained were stained with Giemsa and DAPI solution. For meiotic and palynological analyzes, inflorescences at different stages of development were collected and fixed. Anthers were subjected to the crushing technique to obtain meiotic and meiotic indexes. Mature pollen grains were used for pollen viability analyzes with colorimetric tests and were evaluated cytochemically. In order to evaluate the pattern of exine ornamentation and other pollen characteristics, mature pollen grains were submitted to the acetolysis technique and analyzed under light field microscopy and scanning electron microscopy. The results of the mitotic analysis confirmed the chromosome number reported for the species ($2n = 4x = 28$), with the presence of very small and symmetric chromosomes containing regions rich in telomeric and pericentromeric Adenine/Thymine. These data corroborate a chromosomal uniformity of the genus. The species presented meiotic indexes above 95%, although it presented low pollen viability index (62% and 68% for 5% Acetic Acid and Alexander Solution methods, respectively). The pollen grains were positive for starch and lipid. The pollen morphometry revealed pollen grains of small size, triangular form, oblato-spheroidal and tricolporate. In addition, through the analysis with scanning electron microscopy the exine was characterized as striated-reticulated. These data are important and can be used in systematic, taxonomic, evolutionary studies. Likewise, it may also aid in the development of strategies for the conservation and sustainable management of the species.

Keywords: Aroeira-vermelha. Chromosome number. Meiotic index. Pollen Morphology

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-SIERRA, Clara Isabel; MELHEM, Therezinha Sant'anna. Morfologia polínica da tribo Bursereae (Burseraceae) na América do Sul. **Revista brasileira Botânica**, São Paulo, V.21, n.1, p.17-26, abr.1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84041998000100003>. Acesso em: 26. Out. 2016.
- ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Revista Stain Technology**, Baltimore, v. 55, n. 1, p. 13-19. 1980.
- ALMEIDA, Alisson Andrade; LEITE, João Paulo Viana. **A hora e a vez da aroeirinha**. 2010. Disponível em: <<https://www2.cead.ufv.br/espacoProdutor/scripts/verArtigo.php?codigo=22&acao=exibir>>. Acesso em: 30 set. 2016.
- AMORIM, Melania Maria Ramos; SANTOS, Luiz Carlos. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. v.25. n.2.p.95-102.2003
- BAKER, Hebert G.; BAKER, Irene. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v.66, p.591-600, 1979.
- BIONDO, Elaine; MIOTTO, Silvia Teresinha Sffoggia; SCHIFINO-WITTMANN, Maria Teresa., Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae –leguminosae do Sul do Brasil. 2005. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 15, n. 3, p. 241-248.2005.
- BLACKMORE, S. Pollen and spores: microscopic Keys to understanding the earth's biodiversity. **Revista Plant Systematics and Evolution**.v.263.p.3-12. 2007.
- CARVALHO, Carlos Roberto. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1995.
- COELHO, Maria do Socorro Evangelista. 2009. **Caracterização citogenética de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* DEG., *P. cincinnata* MAST. e seu híbrido interespecífico**. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.
- CORADIN, Lidio; SIMINSKI, Alexandre; REIS, Ademir. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região sul**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente. 934p. 2011.
- COSTA, Nilton Pereira da; NETO, José de Barros França.; KRZYNOWSKI, Francisco Carlos; HENNING, Ademir Assis. **Metodologia alternativa para o teste de tetrazólio em sementes de soja – Série Sementes**. EMBRAPA. Circular técnica. n.39. Londrina, PR, 2007. Disponível em:< http://www.cnpso.embrapa.br/download/pdf/cirtec39_sementes.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2016.

CUDA, J. P., A. P. FERRITER, V. MANRIQUE, MEDAL, J.C. **Brazilian Pepper tree Task Force Chair. Interagency Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* R.) Management Plant for Florida.** ed.2. 2006.

CRUZ-BARROS, Maria Amélia Vitorino da; GRANITO, Carla Rodrigues. **Flora polínica da reserva do parque estadual das fontes do Ipiranga.** (São Paulo, Brasil). 1997.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M.R.M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Ciência e Agrotecnologia.** v.29.n.3.p.617-622, 2005.

DIEGUES, Isabela Pereira; JUNIOR, Pedro Corrêa Damasceno; RIBEIRO, Nathália Virgínia da Silva; REIS, Marcus Vinicius Magro; ABBoud, Antônio Carlos de Souza. Comportamento meiótico e viabilidade polínica na espécie *Jatropha curcas* L. **Revista Ciências Agrárias**, Londrina, v.36, n.1, p.141-150, jan/fev.2015. Disponível em:<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/14926/16036>>. Acesso em: 02. nov.2016.

ERDTMAN, Gunnar. The acetolysis method, a revised description. **Svensk Botanic Tidskr.**v.54 p.561-564, 1960.

FRANCO-CAIRO, João Paulo Lourenço; GUEDES, M.L.S.; OLIVEIRA, A.L.P.C. Análises citogenéticas em espécies de Angiospermae de um ecossistema de restinga. In: **55º Congresso brasileiro de genética.** 2009, Águas de Lindóia. **Anais.** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de genética, 2009. CD.

GASPARINO, Eduardo C.; CRUZ-BARROS, Maria Amélia V. Palinologia. **Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente.** Instituto de Botânica. São Paulo. 2006. Disponível em:<http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Palinologia_Eduardo_Gasparino.pdf>. Acesso em: 19 out 2016.

GUERRA, Marcelo. **Introdução a citogenética geral.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUERRA, Marcelo. Cytogenetics of Rutaceae IV. Structure and systematic significance of interphase nuclei. **Revista Cytologia**, v. 52, p. 213-222, 1987.

JUDD, Walter S.; CAMPBELL, Christopher S.; KELLOGG, Elizabeth A.; STEVENS, Peter F.; DONOGHUE, Michael J. **Revista Sistemática vegetal: um enfoque filogenético.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.632p.

JÚNIOR, M.A.P.; CÔRREA, M.V.G.; MACEDO, R.B.; CANCELLI, R.R.; BAUERMANN, S.G. **Revista grãos de pólen: Usos e aplicações.** 24p. 2006.

KEARNS, C.A.; INOUE, D.W. **Techniques for pollination biologist.** University of Colorado, Niwot. 1993.

LENZI, Maurício; ORTH, Afonso Inácio; LAROCA, Sabrina. Associação das abelhas silvestres (Hymenoptera, Apoidea) visitantes florais de *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), na Ilha de Santa Catarina (sul do Brasil). **Revista Biológica Paranaense**, Curitiba v. 32, n.1,p.107–127, 2003.

LOGUERCIO, Andrea Pinto; BATTISTIN, Alice. Microsporogênese de nove acessos de *Syzygium cumini* (L.) Myrtaceae e oriundos do Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 11, n. 1, p. 192-205, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 5. ed. Nova Odessa (SP). Plantarum 2008. 2v. Nova Odessa, São Paulo.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**. Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512. 32p.

LOVE, R.M. **Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses**. Porto Alegre: Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio. 23p. 1949.

LUZ, Leandro Vinicius. **Caracterização citogenética em acessos do Rio Grande do Sul de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2013.

MARTINS, Kellen Coutinho.; PEREIRA, Telma Nair Santana; SOUZA, Sérgio Alessandro Machado; COSTA, Fabiane Rabelo da., Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annuum* e *Capsicum baccatum*. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.40,n.8,p.1746-1751, ago.2010.

MEDEIROS, Antonio Carlos de Souza; ABREU, Daniela Cleide Azevedo de., **Instruções para Testes de Germinação de Sementes Florestais Nativas da Mata Atlântica**. Comunicado técnico EMBRAPA. Colombo/PR. 2005.

MEDEIROS, Antonio Carlos de S.; ZANON, Ayrton. **Substratos e temperaturas para teste de germinação de sementes de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Comunicado técnico. Embrapa. n.32, p.1-3.1998.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). 1998. **Primeiro relatório nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/destaques/item/7926>>. Acesso em: 30 out. 2016.

MUÑOZ, J.D. **Anacardiaceae. Flora fanerogamica Argentina**. n.65.p1-28. Conicet. Córdoba, Argentina. 2000.

OGINUMA, K.A.; KATO, A.; TOBE, H.; MATHENGE, S.G.; JUMA, F.D. **Chromosomes of some plants in Kenya**. Geobotanica. 44:53-58.1993.

OLIVEIRA, Andréa dos Santos. **Qualidade fisiológica de sementes de limão volkameriano (*Citrus Volkameriana* Tan. e Pasq.) submetidas ao condicionamento osmótico**. Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE Monografia. 53p. 2004.

OLIVEIRA, Lohanna Baltar Pinto de. **Comportamento meiótico e análise polínica de Cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* DC – Myrtaceae)**. Trabalho de conclusão de curso (graduação). 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/157173/TCC%20_%20VERS%C3%83O%20Final%20corrigida%20_%20Lohanna%20Baltar.pdf?sequence=1>. Acesso em: 24 out. 2016.

PACINI, Ettore, HESSE, Michael. Pollenkitt – its composition and functions. **Flora**. Aschaffenburg, v. 200, p. 399-415, 2005.

PACINI, Ettore; GUARNIERI, Massimo; NEPI, McChochie. Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. **Protoplasma**, v.228, p.73-77,2006.

PAGLIARINI, Maria Sueli. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Revista Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 91-96, 2000.

PAGLIARINI, Maria Sueli; POZZOBON, Marisa Toniolo. Meiose vegetal: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADA A RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS, 2., 2004, Brasília. **Anais**. Brasília, p.24 - 41, 2004.

PELL, S.K.; MITCHELL, J.D.; MILLER, A.J.; LOBOVA, T.A .Anacardiaceae.In K. Kubitzki (ed.) The families and genera of vascular plants. X. Flowering plants. Eudicots.Sapindales, Curcubitales, Myrtales. Springer, Berlin, p. 7-50., 2011.

PEÑAS, M.L.L.; BERNADELLO, G.; STEIHEL, P.E.; TROIANI, H.O. **Cytogenetic studies in *Schinus* species (Anacardiaceae)**. *Arnaldia* 13(2): 270-275, 2006.

PEREIRA, Andreza Stephanie de Souza; FÉLIX-DA-SILVA, Maria Maricélia; BARBOSA, Camilo Veríssimo de Oliveira; SMITH, Clarisse Beltrão. **Estudo polínico de *Anacardium* L. (Anacardiaceae) no estado do Pará (Amazônia Oriental), Brasil**. 2014. Macapá. v.4, n.3, p.57-61. Disponível em:< <https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/925>>. Acesso em: 20 out. 2016.

POZZOBON, Marisa Toniolo; SOUZA, Karina de; CARVALHO, Sabrina Isabel Costa de; REIFSCHNEIDER, Francisco José Becker. Meiose e viabilidade polínica em linhagens avançadas de pimenta. **Revista Horticultura Brasileira**, v.29, p.212-216, 2011.

PUNT, Win.; BLACKMORE, Stephen.; NILSSON, Siwert & LE THOMAS, Annick. 1994. **Glossary of pollen and spore terminology**. Uthrecht, L.P.P.Foundation. Disponível em:<<http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>>. Acesso em: 26 out. 2016.

QUINTÃO, T.L.; BERNARDI, K., THOMAZ, L.D.; PIERRE, P.M.O. Citogenética e palinologia de *Schinus terebinthifolius* RADDI (Anacardiaceae). In: **XXXI Encontro Regional de botânicos de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo**. 2011, Viçosa. *Anais*.Universidade Federal de Viçosa., 2011

RIBAS, Marina de Oliveira; SOUSA, Maria Helena; SARTORETTO, Josiane; LANZONI, Thaís Almeida; NORONHA, Lúcia; ACRA, Luís Antonio. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odontologia Ciência** - Faculdade Odonto/PUCRS v.21.n.53.p.245-252, 2006.

RODRIGUEZ-GUARCIA, M. I., RANI-ALAOUI, M., FERNANDEZ, M. C. Behavior of storage lipids during development and germinationof olive (*Olea europaea* L.) pollen. **Revista Protoplasma**, v. 221, p.237–244, 2003.

RUAS, Eduardo Augusto. **Estudos de diversidade genética e anatomia ecológica de populações da espécie arbórea ciliar da Bacia do Rio Tibagi *Schinus terebinthifolius***

Raddi (Anacardiaceae). Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Universidade Estadual de Londrina- UEL. Londrina. 2006.

SABBI, Larissa de B. Chiamolera; ÂNGELO, Alessandro Camargo; BOEGER, Maria Regina. **Influência da luminosidade nos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) implantadas em duas áreas com diferentes graus de sucessão, nas margens do Reservatório Iraí, Paraná, Brasil.** Iheringia, Série Botânica.v.65.n.2.p.171-181.,2010.

SANTOS, Ana Cristina Atti dos, ROSSATO, Marcelo, AGOSTINI, Fabiana, ALMEIDA Máira Lermen de, PAULETTI, Gabriel Fernandes, SERAFINI, Luciana Atti, MOYNA, Patrick, DELLACASSA, Eduardo. Caracterização química de populações de *Schinus molle* L. do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 1014-1016, jul. 2007.

SANTOS, Ana Cristina Atti; ROSSATO, Marcelo; SERAFINI, Gabriel Fernandes; BUENO, M.; Crippa, L.B.; SARTORI, V.C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. 2010. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n .20.v.2.p.154-159.

SANTOS, Taynara Antunes dos.; TIAGO, Poliana Vicente; SCHMITT, Kátia Fabiane Medeiros; MARTINS, Kellen Coutinho; ROSSI, Ana Aparecida Bandini. **Viabilidade polínica em *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) baseada em diferentes testes colorimétricos.** 2015. Centro Científico Conhecer. Goiânia, v.11. n.22. Disponível em: < <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/biologicas/viabilidade%20polinica.pdf>>. Acesso em: 26 out. 2016.

SANTOS, Cristina Magalhães Ribas dos.; FERREIRA, Alfredo Gui; ÁQUILA, Maria Estefânia Alves; Características de frutos e germinação de sementes de seis espécies de Myrtaceae nativas do Rio Grande do Sul. 2004. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 14, n. 2, p. 13-20.

SILVA, A.B.; SILVA, T.; FRANCO, E.S.; RABELO, S.A.; LIMA, E.R.; MOTA, R.A.;CÂMARA, C.A.G.; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial activity, chemical composition and cytotoxicity of leafs essential oil from brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). 2010. **Brazilian Journal of Microbiology** v.41. p.158-163.

STEBBINS, George Ledyard. **Chromosomal evolution in higher plants.** J. W. Arrowsmith, 1971. 216 p.

TAKAHASHI, Masaya. Evolution and diversification of land plants. Tokio/Berlin/Nova Iorque: Springer-Verlag. 329p.1997.

TECHIO, Vânia Helena. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp.** 2002. 104 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

WANG, Y.Q.; ZHANG, D.X.; CHEN, Z.Y. Pollen Histochemistry and Pollen: Ovule Ratios in Zingiberaceae. **Annals of Botany** v.94,p.583-591. 2004.

WEEKS, A., ZAPATA, F., PELL, S.K., DALY, D.C., MITCHELL, J.D. & FINE, P.V.A. To move or to evolve: contrasting patterns of intercontinental connectivity and climatic niche evolution in "terebinthaceae" (Anacardiaceae and Burseraceae) p.5-409. 2014.

WILLARD, D.A.; BERNHARDT, C.E.; WEIMER, L.; COOPER, S.; GAMEZ, D.; JENSEN, J. Atlas of pollen and spores of the Florida everglades. **Palynology**. n.28, p.125-227., 2004.